



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

| | | |
|---|-----------|--|
| <p>(51) 国際特許分類7 C12Q 1/68, C12N 15/11, 15/00</p> | <p>A1</p> | <p>(11) 国際公開番号 WO00/66775</p> <p>(43) 国際公開日 2000年11月9日(09.11.00)</p> |
| <p>(21) 国際出願番号 PCT/JP00/02807</p> <p>(22) 国際出願日 2000年4月28日(28.04.00)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平11/122725 1999年4月28日(28.04.99) JP 特願2000/52623 2000年2月29日(29.02.00) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 住友製薬株式会社 (SUMITOMO PHARMACEUTICALS COMPANY, LIMITED)[JP/JP] 〒541-0045 大阪府大阪市中央区道修町二丁目2番8号 Osaka, (JP)</p> <p>(72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてののみ) 鎌滝哲也(KAMATAKI, Tetsuya)[JP/JP] 〒064-0808 北海道札幌市中央区南八条西二十三丁目 1-33-401-14 Hokkaido, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 細田芳徳(HOSODA, Yoshinori) 〒540-0012 大阪府大阪市中央区谷町二丁目8番1号 大手前M2ビル 細田国際特許事務所内 Osaka, (JP)</p> | | <p>(81) 指定国 AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM)</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書 請求の範囲の補正の期限前の公開 ; 補正書受領の際には再公 開される。</p> |
| <p>(54)Title: CYP2A6 GENE JUDGMENT METHODS</p> <p>(54)発明の名称 CYP2A6遺伝子診断法</p> <p>(57) Abstract A method for judging the genotype of CYP2A6 gene based on the difference in gene structure between wild type CYP2A6 gene and at least one variant gene concerning variation in CYP2A6 gene; the above method for judging genotype by using a variant gene concerning variation in CYP2A6 gene, wherein the variant gene is a substituted CYP2A6 gene containing the base sequence represented by SEQ ID NO:4; the above method for judging homo-defection and hetero-defection of CYP2A6 gene by using at least two variant genes concerning variation in CYP2A6 gene; a method for judging the genotype of CYP gene characterized by involving the above-described method; and a diagnosis kit, etc. for judging the genotype of CYP2A6 gene containing a 5'-primer hybridizable with both of the exon 8 of CYP2A6 gene and the exon 8 of CYP2A7 gene, a 3'-primer hybridizable specifically with the exon 9 of CYP2A6 gene, AccII or its isoschizomer and Eco81I or its isoschizomer.</p> | | |

(57)要約

本発明は、*CYP 2 A 6*の野生型遺伝子と、*CYP 2 A 6*遺伝子の変異に関連する少なくとも1種の変異型遺伝子との遺伝子構造の差異に基づいて、*CYP 2 A 6*遺伝子の遺伝子型を判定する方法；*CYP 2 A 6*遺伝子の変異に関連する1種の変異型遺伝子を用いる遺伝子型の判定方法であって、該変異型遺伝子が配列番号：4に記載の塩基配列を含有する置換型*CYP 2 A 6*遺伝子である前記方法；*CYP 2 A 6*遺伝子の変異に関連する少なくとも2種の変異型遺伝子を用いて*CYP 2 A 6*遺伝子のホモ欠損およびヘテロ欠損を判定する前記方法；*CYP*遺伝子の遺伝子型の判定を行うに際し、前記方法を含む方法により行うことを特徴とする*CYP*遺伝子の遺伝子型の判定方法；ならびに*CYP 2 A 6*遺伝子のエキソン8および*CYP 2 A 7*遺伝子のエキソン8のいずれにもハイブリダイズする5'-プライマー、*CYP 2 A 6*遺伝子のエキソン9に特異的にハイブリダイズする3'-プライマー、*A c c I I*またはそのイソシゾマーならびに*E c o 8 1 I*またはそのイソシゾマーを含有してなる、*CYP 2 A 6*遺伝子の遺伝子型を判定するための診断キット等を提供するものである。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

| | | | |
|-----------------|------------|-------------------|---------------|
| AE アラブ首長国連邦 | DM ドミニカ | KZ カザフスタン | RU ロシア |
| AG アンティグア・バーブーダ | DZ アルジェリア | LC セントルシア | SD スーダン |
| AL アルバニア | EE エストニア | LI リヒテンシュタイン | SE スウェーデン |
| AM アルメニア | ES スペイン | LK スリ・ランカ | SG シンガポール |
| AT オーストリア | FI フィンランド | LR リベリア | SI スロヴェニア |
| AU オーストラリア | FR フランス | LS レソト | SK スロヴァキア |
| AZ アゼルバイジャン | GA ガボン | LT リトアニア | SL シェラ・レオネ |
| BA ボスニア・ヘルツェゴビナ | GB 英国 | LU ルクセンブルグ | SN セネガル |
| BB バルバドス | GD グレナダ | LV ラトヴィア | SZ スワジランド |
| BE ベルギー | GE グルジア | MA モロッコ | TD チャード |
| BF ブルキナ・ファソ | GH ガーナ | MC モナコ | TG トーゴ |
| BG ブルガリア | GM ガンビア | MD モルドヴァ | TJ タジキスタン |
| BJ ベナン | GN ギニア | MG マダガスカル | TM トルクメニスタン |
| BR ブラジル | GR ギリシャ | MK マケドニア旧ユーゴスラヴィア | TR トルコ |
| BY ベラルーシ | GW ギニア・ビサウ | 共和国 | TT トリニダード・トバゴ |
| CA カナダ | HR クロアチア | ML マリ | TZ タンザニア |
| CF 中央アフリカ | HU ハンガリー | MN モンゴル | UA ウクライナ |
| CG コンゴ | ID インドネシア | MR モリタニア | UG ウガンダ |
| CH スイス | IE アイルランド | MW マラウイ | US 米国 |
| CI コートジボアール | IL イスラエル | MX メキシコ | UZ ウズベキスタン |
| CM カメルーン | IN インド | MZ モザンビーク | VN ヴェトナム |
| CN 中国 | IS アイスランド | NE ニジェール | YU ユーゴスラヴィア |
| CR コスタ・リカ | IT イタリア | NL オランダ | ZA 南アフリカ共和国 |
| CU キューバ | JP 日本 | NO ノールウェー | ZW ジンバブエ |
| CY キプロス | KE ケニア | NZ ニュー・ジーランド | |
| CZ チェッコ | KG キルギスタン | PL ポーランド | |
| DE ドイツ | KP 北朝鮮 | PT ポルトガル | |
| DK デンマーク | KR 韓国 | RO ルーマニア | |

明 細 書

CYP2A6 遺伝子診断法

技術分野

本発明は、ヒトチトクロームP4502A6（以下、CYP2A6と略記する）の基質となる物質の代謝能を判別するための、CYP2A6遺伝子型の診断方法および診断キットなどに関する。

背景技術

CYP2A6には遺伝子多型が存在しており、基質となる物質の代謝能の個体差の原因となることが示されている（特開平9-187300号公報、J. Pharmacol. Exp. Ther. 1999, 289(1): 437-442）。PAF（血小板活性化因子）受容体アンタゴニストである（+）-シス-3, 5-ジメチル-2-（3-ピリジル）チアゾリジン-4-オン（SM-12502）は、CYP2A6の代表的基質であり、CYP2A6遺伝子の全欠損型変異を有する者では、SM-12502の生体内での代謝能が低いことが知られている（特開平9-187300号公報、J. Pharmacol. Exp. Ther. 1999, 289(1): 437-442）。従って、SM-12502等のCYP2A6の基質となる薬物を投与する前に、患者の遺伝子型を診断し、あらかじめ代謝能を知っておくことは、副作用を防ぎ患者の個体差に応じた適切な治療を施すという観点から、非常に有用であると考えられる。

このような観点から、本発明者らは従来よりCYP2A6遺伝子の全欠損型変異を診断する方法を検討してきた。特開平9-187300号公報およびJ. Pharmacol. Exp. Ther. 1999, 289(1): 437-442において、CYP2A6遺伝子のエキソン1～9の欠失が示唆された。その後、この欠失型遺伝子の構造を解明することにより、ホモ欠損者（ホモ欠損とは、対立遺伝子の両方が欠損していること

を言う)を判定する診断法を開発した(Pharmaceutical Res., 15(4), pp517-524, 1998 に診断法の概要のみ記載)。しかしこの診断法による診断では、ヘテロ欠損者(ヘテロ欠損とは、対立遺伝子の一方が欠損していることを言う)の頻度が理論的に算出される頻度よりもはるかに高いという予期せぬ問題が生じた。

従って、本発明の目的は、患者におけるSM-12502等のヒトCYP2A6の基質となる物質の代謝能を判別するための、ヒトCYP2A6遺伝子の診断方法および診断キットなどを提供することにある。

発明の開示

CYP2A6遺伝子の全欠損型変異をヘテロで有する場合にも酵素活性に影響のある可能性があるため、患者の個体差に応じた適切な治療という観点から、ホモ欠損者のみならずヘテロ欠損者も正確に診断する診断法が必要であると考えられる。そこで、本発明者らは、ヘテロ欠損者の頻度が理論的に算出される頻度よりもはるかに高い原因などを種々検討した結果、従来に報告のない新たな多型遺伝子の存在が考えられたため、前記旧診断法(Pharmaceutical Res., 15(4), pp 517-524, 1998)でヘテロと判定されたヒト肝臓試料からCYP2A6 cDNAをクローニングし、その塩基配列を解析した。その結果、5'-非翻訳領域およびコード領域には変異はなく、3'-非翻訳領域の約60bpがCYP2A7遺伝子の対応領域に置換している新たな多型遺伝子(以下、置換型と称する)を見出した。ここでCYP2A7遺伝子とは、CYP2A6遺伝子と同じ19番染色体上に位置し、CYP2A6遺伝子と相同性の高い、CYP2Aサブファミリーの他の遺伝子である(Am. J. Hum. Genet. 57: 651-660, 1995)。

本発明者らが新たに見出したCYP2A6遺伝子の置換型変異をホモ又はヘテロで有する場合にも酵素活性に影響のある可能性がある。そこで本発明者らは鋭意検討を重ねた結果、これら野生型、全欠損型および置換型の3種類の遺伝子構造の差異に基づき、CYP2A6遺伝子の遺伝子型を診断できる新たな診断法を

確立することに成功し、本発明を完成するに至った。

即ち本発明は、

- (1) ヒトチトクローム P 4 5 0 2 A 6 (*CYP 2 A 6*) の野生型遺伝子と、*CYP 2 A 6* 遺伝子の変異に関連する少なくとも 1 種の変異型遺伝子の遺伝子構造の差異に基づいて、*CYP 2 A 6* 遺伝子の遺伝子型を判定する方法、
- (2) 該変異型遺伝子に生じた少なくとも 1 つの変異が、ヒトチトクローム P 4 5 0 2 A 7 (*CYP 2 A 7*) 遺伝子のエキソン 9 または *CYP 2 A 6* 遺伝子のエキソン 9 に存在する、前記 (1) 記載の方法、
- (3) *CYP 2 A 6* 遺伝子の変異に関連する 1 種の変異型遺伝子を用いる遺伝子型の判定方法であって、該変異型遺伝子が配列番号：4 に記載の塩基配列を含有する置換型 *CYP 2 A 6* 遺伝子である前記 (1) 記載の方法、
- (4) *CYP 2 A 6* 遺伝子の変異に関連する少なくとも 2 種の変異型遺伝子を用いて *CYP 2 A 6* 遺伝子のホモ欠損およびヘテロ欠損を判定する前記 (1) 記載の方法、
- (5) *CYP 2 A 6* 遺伝子の変異に関連する少なくとも 2 種の変異型遺伝子が、配列番号：1 に記載の塩基配列を含有する全欠損型 *CYP 2 A 6* 遺伝子および配列番号：4 に記載の塩基配列を含有する置換型 *CYP 2 A 6* 遺伝子である、前記 (4) 記載の方法、
- (6) PCR 法および／またはハイブリダイゼーション法を含む方法により遺伝子構造の差異を解析することを特徴とする、前記 (1) ～ (5) いずれか記載の方法、
- (7) 下記工程：
 - (a) ヒト組織からゲノム DNA を調製する工程、
 - (b) *CYP 2 A 6* 遺伝子のエキソン 8 および *CYP 2 A 7* 遺伝子のエキソン 8 のいずれにもハイブリダイズする 5' -プライマー、ならびに *CYP 2 A 6* 遺伝子のエキソン 9 に特異的にハイブリダイズする 3' -プライマーを調製する工程

(c) 工程 (a) で調製したゲノムDNAを鋳型とし、工程 (b) で調製したプライマーをプライマー対としてPCR反応による増幅反応を行なう工程、ならびに

(d) 工程 (c) で得られた増幅産物を制限酵素で消化して、制限酵素長多型を検出する工程、

を含む、前記 (1) ~ (6) いずれか記載の方法。

(8) 5' - プライマーが配列番号 : 5 に記載の塩基配列を有し、3' - プライマーが配列番号 : 6 に記載の塩基配列を有するものである、前記 (7) 記載の方法、

(9) 制限酵素がA c c IIまたはそのイソシゾマー、およびE c o 8 1 Iまたはそのイソシゾマーである、前記 (7) または (8) 記載の方法、

(10) 配列番号 : 4 に記載の塩基配列における *CYP2A6* 遺伝子と *CYP2A7* 遺伝子との少なくとも1つの境界領域を含む、少なくとも5 b p 以上の長さのDNA断片を用い、野生型 *CYP2A6* 遺伝子と置換型 *CYP2A6* 遺伝子との遺伝子構造の差異を解析することを含む、前記 (6) 記載の方法、

(11) 下記工程 :

(a) ヒト組織からゲノムDNAを調製する工程、

(b) 配列番号 : 4 に記載の塩基配列における *CYP2A6* 遺伝子と *CYP2A7* 遺伝子との少なくとも1つの境界領域を含む、少なくとも5 b p 以上の長さのDNA断片を用い、工程 (a) で調製したゲノムDNAまたはその断片とのハイブリダイゼーション反応を行う工程、

を含む、前記 (10) 記載の方法、

(12) DNA断片が固相上に結合した形態であることを特徴とする、前記 (10) または (11) 記載の方法、

(13) *CYP* 遺伝子の遺伝子型の判定を行うに際し、前記 (1) ~ (12) い

ずれか記載の方法を含む方法により行うことを特徴とする *CYP* 遺伝子の遺伝子型の判定方法、

(14) 配列番号：4 に記載の塩基配列を含有する置換型 *CYP 2A 6* 遺伝子、

(15) 配列番号：4 に記載の塩基配列における *CYP 2A 6* 遺伝子と *CYP 2A 7* 遺伝子との少なくとも1つの境界領域を含む、少なくとも5bp以上の長さのDNA断片、

(16) 配列番号：4 に記載の塩基配列における *CYP 2A 6* 遺伝子と *CYP 2A 7* 遺伝子との2つの境界領域を含む、少なくとも60bp以上の長さのDNA断片、

(17) 前記(15)又は(16)記載のDNA断片の結合した固相、

(18) 前記(15)又は(16)記載のDNA断片、あるいは前記(17)記載の固相を含有してなる、*CYP* 遺伝子の遺伝子型を判定するための診断キット、

(19) 配列番号：5又は6に記載の塩基配列を有するDNA断片、

(20) *CYP 2A 6* 遺伝子のエキソン8および *CYP 2A 7* 遺伝子のエキソン8のいずれにもハイブリダイズする5' -プライマー、*CYP 2A 6* 遺伝子のエキソン9に特異的にハイブリダイズする3' -プライマー、AccIIまたはそのイソシゾマー、ならびにEco81Iまたはそのイソシゾマーを含有してなる、*CYP 2A 6* 遺伝子の遺伝子型を判定するための診断キット、並びに

(21) 5' -プライマーが配列番号：5に記載の塩基配列を有し、3' -プライマーが配列番号：6に記載の塩基配列を有するものである、前記(20)記載の診断キット、に関する。

図面の簡単な説明

第1図は、実施例1でクローニングされたPMおよびEMの *CYP 2A 7* 遺伝子のエキソン9の塩基配列の整列を示す。図中、太字の塩基は翻訳領域を示し、

Sequence A および B は *CYP2A7* 遺伝子特異的な領域を示す。影付きのボックスで囲んだ部分は、*CYP2A6* 遺伝子の 3' - UTR の 3' - UTR 特異的な 15 bp の欠失を示す。

第 2 図は、*CYP2A6* の野生型遺伝子と全欠損型遺伝子の構造を比較した模式図である。

第 3 図は、実施例 2 でクローニングされた野生型および置換型 *CYP2A6* 遺伝子のエキソン 9 の 3' 末端側の塩基配列の整列を示す。図中、下線の部分は、*CYP2A7* 遺伝子に特徴的な領域を示す。

第 4 図は、本発明の診断方法で判別可能な 3 種の *CYP2A6* 遺伝子構造（野生型遺伝子構造、全欠損型遺伝子構造および置換型遺伝子構造）を表す模式図である。図中、右向きの矢頭は 5' - プライマー（配列番号：5）がハイブリダイズする位置を示し、左向きの矢頭は 3' - プライマー（配列番号：6）がハイブリダイズする位置を示す。両矢頭間を結ぶ線は、PCR で増幅される領域であり、上向きの矢頭は *Eco81I* 切断位置を、矢印は *AccII* 切断位置をそれぞれ示す。

第 5 図は、a) *AccII*-RFLP、および b) *Eco81I*-RFLP の模式図である。

第 6 図は、本発明の診断方法による、日本人健常者の a) *AccII*-RFLP、および b) *Eco81I*-RFLP の結果を示す電気泳動〔パネル（A）〕ならびにそれらに対応する模式図〔パネル（B）〕の写真である。図中、M. W. は DNA のサイズマーカーを示し、* 1 A / * 1 A、* 1 A / * 1 B、* 1 B / * 1 B、* 1 A / * 4 C、* 1 B / * 4 C および * 4 C / * 4 C は、野生型（*CYP2A6* * 1 A）、置換型（*CYP2A6* * 1 B）および全欠損型（*CYP2A6* * 4 C）の遺伝子型を表す。

発明を実施するための最良の形態

本発明は、ヒトチトクロームP 4 5 0 2 A 6 (CYP 2 A 6)の野生型遺伝子と、CYP 2 A 6遺伝子の変異に関連する少なくとも1種、好ましくは少なくとも2種の変異型遺伝子の遺伝子構造の差異に基づいて、CYP 2 A 6遺伝子の遺伝子型を判定する方法を提供する。本発明の遺伝子型の判定方法においては、前記3種類の遺伝子の構造の差異を検出することができるため、例えば従来課題であったホモ欠損およびヘテロ欠損を正確に診断することができるという優れた効果を発揮する。

本発明の遺伝子診断方法で診断されるCYP 2 A 6とは、薬物、化学発癌物質、環境汚染物質等の外因性基質またはステロイド、脂肪酸等の内因性基質といった、構造的に無関係な幅広いグループの化合物の代謝に関与するユビキタスな1原子酸素添加酵素のスーパーファミリーからなるヒトチトクロームP-4 5 0 の1員であり、その遺伝子のcDNAの塩基配列は、Biochemistry 29: 1322-1329, 1990に記載されている。CYP 2 A 6の基質としては、クマリンまたはSM-1 2 5 0 2等が知られている。

本発明において、「CYP 2 A 6の野生型遺伝子(野生型CYP 2 A 6遺伝子)」とは、前記Biochemistry 29: 1322-1329, 1990に記載の塩基配列を有する遺伝子をいう。

本発明において、「CYP 2 A 6遺伝子の変異に関連する少なくとも1種の変異型遺伝子」とは、CYP 2 A 6遺伝子において認められる少なくとも一部の配列を含み、かつ野生型において認められる塩基配列とは異なる塩基配列を含む遺伝子であれば特に限定されないが、例えば、CYP 2 A 7遺伝子の一部配列を含む変異型CYP 2 A 6遺伝子等が挙げられる。

また、本発明において、「CYP 2 A 6遺伝子の変異に関連する少なくとも2種の変異型遺伝子」とは、CYP 2 A 6遺伝子において認められる少なくとも一部の配列を含み、かつ野生型において認められる塩基配列とは異なる塩基配列を含む遺伝子であれば特に限定されないが、例えば、CYP 2 A 7遺伝子の一部配

列を含む変異型 *CYP2A6* 遺伝子等の 2 種以上のもの、好ましくは、配列番号：1 に記載の塩基配列を含有する全欠損型 *CYP2A6* 遺伝子および配列番号：4 に記載の塩基配列を含有する置換型 *CYP2A6* 遺伝子が挙げられ、かかる 2 種の変異型遺伝子を、*CYP2A6* 遺伝子のホモ欠損およびヘテロ欠損の判定に用いるのが好ましい。

該変異型遺伝子に生じた少なくとも 1 つの変異としては、*CYP2A7* 遺伝子のエキソン 9 または *CYP2A6* 遺伝子のエキソン 9 に存在するものが挙げられる。なお、*CYP2A7* 遺伝子の cDNA の塩基配列は、Am. J. Hum. Genet. 57 : 651-660, 1995 または Genbank Accession No. U22029 に記載されている。

前記変異型遺伝子の構造の具体例としては、*CYP2A6* 遺伝子の上流には *CYP2A7* 遺伝子が存在しているが、*CYP2A6* 遺伝子の 5' - 非翻訳領域および翻訳領域に相当する部分が欠失し、*CYP2A7* 遺伝子のエキソン 9 部分の後半 (3' - 非翻訳領域、以下 3' - UTR と略す) が *CYP2A6* 遺伝子のエキソン 9 部分の 3' - UTR と直接連結している全欠損型遺伝子 (全欠損型 *CYP2A6* 遺伝子) 構造、および野生型 *CYP2A6* 遺伝子のエキソン 9 の 3' - UTR の約 60 bp が *CYP2A7* 遺伝子の対応領域に置換している置換型遺伝子 (置換型 *CYP2A6* 遺伝子) 構造が挙げられる。

より具体的には、全欠損型 *CYP2A6* 遺伝子としては配列番号：1 に記載の塩基配列を含むものが挙げられ、また置換型 *CYP2A6* 遺伝子としては配列番号：4 に記載の塩基配列を含むものが挙げられる。

これら全欠損型および置換型 *CYP2A6* 遺伝子と野生型 *CYP2A6* 遺伝子の構造の模式図を、第 4 図に示す。

本発明において「遺伝子構造の差異」とは、エキソン-イントロン構造が異なっていること等、塩基配列が異なっていることをいう。

本発明の *CYP2A6* 遺伝子の遺伝子型の判定方法は、薬剤投与対象の患者における *CYP2A6* の機能 (*CYP2A6* の基質となる物質の代謝能) を事前に

診断することなどを目的とするものである。また、本発明の *CYP2A6* 遺伝子の遺伝子型の判定方法の一態様によれば、*CYP2A6* 遺伝子のホモ欠損およびヘテロ欠損を診断することも可能である。当該判定方法は、置換型 *CYP2A6* 遺伝子および全欠損型 *CYP2A6* 遺伝子の変異部位の構造が本発明において初めて明らかにされたことに基づくものであり、本発明の判定方法によれば、例えば、*CYP2A6* 遺伝子の変異に関連する1種の変異型遺伝子である配列番号：4に記載の塩基配列を含有する置換型 *CYP2A6* 遺伝子を用いることにより、*CYP2A6* 遺伝子の遺伝子型を判定することも可能である。

また、本発明の判定方法は、当業者であれば、通常の遺伝子診断に用いられる手法を組み合わせて適宜構築することができ (Bio Clinica 10 (9), 1995, 18-23)、当該判定方法においては、かかる手法を含む方法により遺伝子構造の差異を解析して遺伝子型を判定する。

具体的には、例えばPCR法 (PCR 2:A Practical Approach (eds. M. J. McPherson, et. al.) 1995, IRL Oxford)、ハイブリダイゼーション法 (Br. J. Haematology (1990) 75, 73-77)、RFLP法 (J. Clinical Investigation (1985) 76, 1283-1285)、SSCP法 (PNAS (1989) 86, 2766-2770)、直接シーケンス法 (Science (1988) 239, 487-491、Nature (1987) 330, 384-386)、変異塩基対の化学的切断法 (PNAS (1988) 85, 4397-4401)、DGGE法 (Methods in Enzymology (1987) 155, 501-527)、変異塩基対の酵素的切断法 (In Genomic Analysis: A Practical Approach (ed. K. Davies) 95-139, IRL Oxford)、マススペクトル分析法 (Nucleic Acids Res., 28(5), E13 (2000))、及び/又はHPLC法 (Genomics, 56(3), 247-253 (1999)、Hum. Genet., 104(1), 89-93 (1999)) などにより、当該遺伝子構造の差異を解析することができる。好ましくは、PCR法及びハイブリダイゼーション法を含む方法が用いられる。

以下、本発明の *CYP2A6* 遺伝子の遺伝子型の判定法の代表例として、P C

R（ポリメラーゼ連鎖反応）を利用した判定方法について記述する。

本発明においては、PCRにより遺伝子を増幅して診断する方法が用いられ、PCRとしては、LA(Long and Accurate) – PCR等が挙げられる。

PCR後のCYP2A6遺伝子の遺伝子型の判定方法、好ましくはCYP2A6遺伝子のホモ欠損およびヘテロ欠損の判定方法としては、直接シーケンス法、制限断片長多型(RFLP)法等が挙げられ、RFLP法が好ましい。

PCR反応を利用した本発明のCYP2A6の遺伝子の遺伝子型の判定方法の1つの態様は、下記工程：

- (a) ヒト組織からゲノムDNAを調製する工程、
 - (b) CYP2A6遺伝子のエキソン8およびCYP2A7遺伝子のエキソン8のいずれにもハイブリダイズする5' – プライマー、ならびにCYP2A6 遺伝子のエキソン9に特異的にハイブリダイズする3' – プライマーを調製する工程、
 - (c) 工程(a)で調製したゲノムDNAを鋳型とし、工程(b)で調製したプライマーをプライマー対としてポリメラーゼ連鎖反応による増幅反応を行なう工程、ならびに
 - (d) 工程(c)で得られた増幅産物を制限酵素で消化して、制限酵素長多型を検出する工程、
- を含む方法である。

工程(a)において、ヒト組織からゲノムDNAを調製する。ヒト組織としては、ゲノムDNAを単離することができれば特に限定されないが、血液、毛髪、爪、口腔粘膜および肝臓等が挙げられ、量および調製し易さの観点から血液が望ましい。

ゲノムDNAの調製方法は、例えば、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) に記載の常法により行なうことができ、市販のゲノム抽出キット等を利用することもできる。

前記CYP2A6の野生型遺伝子、全欠損型遺伝子および置換型遺伝子を増幅するために、工程(b)において、CYP2A6遺伝子のエキソン8およびCYP2A7遺伝子のエキソン8のいずれにもハイブリダイズする5' -プライマー、ならびにCYP2A6遺伝子のエキソン9に特異的にハイブリダイズする3' -プライマーを調製する。

プライマーの設計に関して、前記3種類のいずれの遺伝子をも増幅し、かつ相同性の高い他のCYP2Aサブファミリーの遺伝子(野生型CYP2A7およびCYP2A13等の遺伝子)の増幅を防ぐようにプライマーを設計することが重要である。このようなプライマーは、全欠損型遺伝子および置換型遺伝子の変異部位の構造が本発明において初めて明らかにされたことに基づき、当業者ならば適宜設計することができる。

ここで、「ハイブリダイズする」とは、例えば、モレキュラー クローニング : ア ラボラトリー マニュアル第2版(1989)に記載の、プローブまたはプライマーのためのオリゴヌクレオチドに関する条件下で、前記CYP2A6の野生型遺伝子、全欠損型遺伝子または置換型遺伝子とのハイブリッドを形成することが可能であることを意味し、かかる性質により、後述の実施例などで具体的に説明されるようなPCR増幅条件下において、前記3種類のいずれの遺伝子をも増幅し、かつ相同性の高い他のCYP2Aサブファミリーの遺伝子の増幅を防ぐ効果を十分に発現しうるものである。

プライマーの長さは、通常10～50塩基であり、好ましくは20～30塩基程度である。かかるプライマーの例は、5' -プライマーとして、配列番号:5の塩基配列を有するかまたは含むオリゴヌクレオチド、3' -プライマーとして、配列番号:6の塩基配列を有するかまたは含むオリゴヌクレオチドが挙げられ、配列番号:5の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドと配列番号:6の塩基配列を有するオリゴヌクレオチドの組合せが好ましい。

プライマーの調製は、DNA合成装置を用いて常法により行なうことができる

。

工程(c)において、工程(a)で調製したゲノムDNAを鋳型とし、工程(b)のプライマーをプライマー対としてポリメラーゼ連鎖反応による増幅反応を行なう。

ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)は、前記Molecular Cloning: A Laboratory Manual 等に記載の方法等、常法により行なうことができる。DNAポリメラーゼは、PCR用の市販のDNAポリメラーゼが好適に使用でき、市販のPCRキットに添付されているポリメラーゼも使用できる。本発明においては、選択したプライマーの位置から約1.3 kb程度の増幅産物が予想されるので、例えば、LA-PCRキット(Takara製)等を用いることが好ましい。

PCRの条件は、前記鋳型、プライマー、増幅される断片長等に応じて適宜設定することが可能である。

工程(d)において、工程(c)で得られた増幅産物を制限酵素で消化して、RFLPを検出する。

ここで、増幅産物の塩基配列を十分考慮して、制限酵素による消化がRFLPを生じるように制限酵素を選択することが好ましい。該制限酵素は、全欠損型遺伝子および置換型遺伝子の変異部位の構造が本発明において初めて明らかにされたことに基づき、当業者ならば適宜選択することができる。1例として、置換型CYP2A6 DNAと全欠損型CYP2A6 DNAをそれぞれ1箇所切断するが野生型CYP2A6 DNAを切断しない制限酵素AclIまたはそのイソシゾマーが使用できる。さらに、全欠損型CYP2A6 DNAを3箇所切断し、野生型CYP2A6 DNAと置換型CYP2A6 DNAをそれぞれ2箇所切断する制限酵素EcoRIまたはそのイソシゾマーも使用できる。これらの制限酵素の切断位置を、第4図において矢印と矢頭で示す。さらに、増幅産物の塩基配列に応じてその他の制限酵素を使用することも可能である。

まず、前記2種類の制限酵素による消化は、別々の反応容器に増幅産物の一部

を入れ、制限酵素の反応条件に従って増幅産物が完全に消化されるまで行なう。制限酵素は、市販の制限酵素を使用することができ、添付のプロトコルに従って消化を行えばよい。

次に、得られた消化断片を電気泳動に供して、RFLPを検出する。電気泳動は、DNAの分離に用いられるアガロースゲル等を用いて、通常の条件下で行なう。消化断片の長さを見積もるために、市販のDNAのサイズマーカーを同時に泳動しておくことが好ましい。電気泳動後のDNA断片の検出は、例えば、臭化エチジウムを前記アガロースゲル等に添加しておき、泳動後UV照射下で、DNAの泳動パターンを目視により観察し、または写真撮影して、サイズマーカーに対する検出対象のDNA断片の相対位置により行う。例えば、第5図に示すように、野生型CYP2A6 DNAと置換型CYP2A6 DNAまたは全欠損型CYP2A6 DNAとを区別できるパターン（第5図a、AccII-RFLP）、ならびに野生型CYP2A6 DNAおよび置換型CYP2A6 DNAと全欠損型CYP2A6 DNAとを区別できるパターン（第5図b、Eco811-RFLP）が得られる。

最後に、前記2種のRFLPに基づいて、CYP2A6遺伝子のホモ欠損およびヘテロ欠損を診断する。例えば、第6図（B）に示すように、ホモ欠損（図中、* 4 C/* 4 Cで示す）とヘテロ欠損（図中、* 1 A/* 4 Cと* 1 B/* 4 Cで示す）が明確に判別される。また、すべての遺伝子型（図中、* 1 A/* 1 A、* 1 A/* 1 B、* 1 B/* 1 B、* 1 A/* 4 C、* 1 B/* 4 Cおよび* 4 C/* 4 Cで示す）も判別できる。

以上が、PCR反応を利用したCYP2A6遺伝子の遺伝子型の判定法の代表例である。

本発明においては、CYP2A6遺伝子の3' -UTRの約60bpがCYP2A7遺伝子の対応領域に置換した「置換型CYP2A6遺伝子」を初めて見出した。置換領域を含む、置換型CYP2A6遺伝子の塩基配列の一部を、配列番

号：4に示す。また、当該置換型 *CYP2A6* 遺伝子の塩基配列の一部（配列番号：4）と野生型 *CYP2A6* 遺伝子の対応する領域の塩基配列（配列番号：3）とを比較したものを、第3図に示す（下線部が *CYP2A7* 遺伝子への置換領域）。ここで配列番号：4に記載の塩基配列における *CYP2A6* 遺伝子と *CYP2A7* 遺伝子との境界領域を含む塩基配列は、置換型 *CYP2A6* 遺伝子に存在しているが野生型 *CYP2A6* 遺伝子には存在していない配列である。従って、当該少なくとも1つの境界領域を含む塩基配列の有無を検出することにより、野生型 *CYP2A6* 遺伝子と置換型 *CYP2A6* 遺伝子との遺伝子構造の差異を解析することができる。かかる態様も、本発明の判定方法の一態様である。

具体的には、配列番号：4に記載の塩基配列における前記境界領域を少なくとも1つ含むDNA断片を診断用のDNAとして用い、前述のPCR反応、ハイブリダイゼーション反応、マススペクトル分析、HPLC分析などを行うことにより、野生型 *CYP2A6* 遺伝子と置換型 *CYP2A6* 遺伝子との遺伝子構造の差異を解析することを含む方法が例示される。

ここで、境界領域を含むDNA断片の長さとしては、野生型 *CYP2A6* 遺伝子と置換型 *CYP2A6* 遺伝子との差異を検出できるものであれば特に限定されず、当業者の常識の範囲で適宜変更可能であるが、少なくとも5bp以上の長さのDNA断片が挙げられる。好ましくは、25bp以上～5kb以下の長さのものが挙げられる。また、*CYP2A6* 遺伝子と *CYP2A7* 遺伝子との2つの境界領域を含む、少なくとも60bp以上の長さのDNA断片なども用いることができる。当該DNA断片は、目的に応じて1本鎖の形態であっても2本鎖の形態であっても良い。

このような *CYP2A6* 遺伝子の遺伝子型の判定方法の1つの態様は、下記工程：

（a）ヒト組織からゲノムDNAを調製する工程、

(b) 配列番号：4に記載の塩基配列における *CYP2A6* 遺伝子と *CYP2A7* 遺伝子との少なくとも1つの境界領域を含む、少なくとも5bp以上の長さのDNA断片を用い、工程(a)で調製したゲノムDNAとのハイブリダイゼーション反応を行う工程、を含む方法である。

工程(a)において、ヒト組織からゲノムDNAを調製する。ヒト組織としては、ゲノムDNAを単離することができれば特に限定されないが、血液、毛髪、爪、口腔粘膜および肝臓等が挙げられ、量および調製し易さの観点から血液が望ましい。

ゲノムDNAの調製方法は、例えば、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)に記載の常法により行なうことができ、市販のゲノム抽出キット等を利用することもできる。調製されたゲノムDNAは、必要に応じて常法により蛍光等でラベルすることも可能である。また、得られたゲノムDNAは必要に応じて断片化したり、PCR反応で特定の部分を増幅するなどして、以下の工程(b)に用いることができる。

工程(b)において、配列番号：4に記載の置換型 *CYP2A6* 遺伝子の塩基配列における *CYP2A6* 遺伝子と *CYP2A7* 遺伝子との少なくとも1つの境界領域を含む、少なくとも5bp以上の長さのDNA断片を用いる。ここで、DNA断片の長さや形態は前述の通りであり、本発明において置換型遺伝子の構造が初めて明らかにされたことに基づき、当業者ならば適宜設計することができる。特に、当該工程(b)においては25bp以上～5kb以下程度のDNA断片が好適に用いられる。これらDNA断片は、DNA合成装置を用いて常法により調製することができる。また、当該DNA断片は必要に応じて蛍光等でラベルすることも可能である。

当該DNA断片を用い、工程(a)で調製したゲノムDNAまたはその断片と

のハイブリダイゼーション反応を行う。ここでハイブリダイゼーションの条件としては、前記Molecular Cloning 等に記載の通常の条件が挙げられる。その他、完全に相補的な配列と部分的な塩基配列の違いを含むものを見分けられる条件であれば、如何なる条件であっても良い。

なお、前記DNA断片は、固相上に結合させた形態でも用いることが可能である。ここで固相とは、ガラス、シリコン表面、ニトロセルロースフィルター、またはナイロンメンブレン等を指す。近年、これら固相上にDNA断片を結合させた、いわゆるDNAチップを用いた診断・判定も行い得る状況にある。この場合、被験用のゲノムDNAは断片化され、また蛍光等でラベルされていることが好ましい。当該ゲノムDNAと固相上のDNA断片とをハイブリダイズさせ、当該固相上の蛍光を検出することにより、前記の判定を行うことができる。ここで、DNA断片を結合したDNAチップは米国アフィメトリックス社に注文することにより入手可能であり、また、前記判定法の具体的な手法については、Nature Genetics, 21, 1-60(1999)等を参考にすることができる。

以上のような *CYP2A6* 遺伝子の遺伝子型の判定方法は、*CYP* 遺伝子全体における遺伝子型の判定方法において利用されるものであり、従って、本発明はまた、前記いずれかの判定方法を含む方法により、*CYP* 遺伝子の遺伝子型の判定を行う、*CYP* 遺伝子の遺伝子型の判定方法を提供するものである。

さらに本発明は、前記した *CYP2A6* 遺伝子の遺伝子型の判定方法において使用される診断用DNAや診断用固相をも提供する。また、これらの診断用DNAや診断用固相を含有してなる診断キットをも提供するものである。

当該診断キットの具体例を、以下に示す。

1) 配列番号：4に記載の塩基配列における *CYP2A6* 遺伝子と *CYP2A7*

遺伝子との少なくとも1つの境界領域を含む少なくとも5bp以上の長さのDNA断片、配列番号：4に記載の塩基配列における *CYP2A6* 遺伝子と *CYP2A7* 遺伝子との2つの境界領域を含む少なくとも60bp以上の長さのDNA断片、あるいはこれらDNA断片の結合した固相を含有してなる診断キット。

2) *CYP2A6* 遺伝子のエクソン8および *CYP2A7* 遺伝子のエクソン8のいずれにもハイブリダイズする5' -プライマー、*CYP2A6* 遺伝子のエクソン9に特異的にハイブリダイズする3' -プライマー、制限酵素 *AccII* またはそのイソシゾマーならびに制限酵素 *Eco81I* またはそのイソシゾマーを含有してなる診断キット。

ここで、前記2)の診断キットの好ましい例としては、以下の3)の診断キットが挙げられる。

3) 配列番号：5に記載の塩基配列を有する5' -プライマー、配列番号：6に記載の塩基配列を有する3' -プライマー、*AccII* またはそのイソシゾマー、ならびに *Eco81I* またはそのイソシゾマーを含有してなる診断キット。

前記キットに含まれる5' -プライマーおよび3' -プライマーならびに制限酵素 *AccII*、*Eco81I* およびそれらのイソシゾマーは、前記規定した通りである。また前記キットは、PCRを行なうためのDNAポリメラーゼ、PCR用の緩衝液、制限酵素反応用緩衝液等をさらに含有してもよい。

本発明のキットは、本発明の診断方法を簡便かつ正確に実施するために用いられる。

以下、本発明を実施例によって説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

実施例1：全欠損型 *CYP2A6* 遺伝子の構造解析

SM-12502の血中濃度測定を行いEM(extensive metabolizer)と推定

された検体、PM(poor metabolizer)と推定された検体(特開平9-187300号公報)の末梢血より、常法(Sambrook et al., Molecular Cloning: A laboratory manual, 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)に従い、ゲノムDNAを抽出した。その後、得られたゲノムDNAをSau3A Iで部分消化し、ショ糖密度勾配(10~38%)遠心分離により分画した。約15 kbのフラグメントを含む画分をdGTPおよびdATPで一部埋め、あらかじめXho Iで切断してdTTPおよびdCTPで一部埋めたラムダFIXIIベクター(Stratagene社)に連結した。次いで、連結産物を、Gigapack III Gold Packaging Extractsを用いてインビトロパッケージングを行った。このようにして作製されたゲノムライブラリーから、1.6 kbのCYP2A6 cDNA断片をプローブとして、PMおよびEMのCYP2A6遺伝子ならびにその上流に位置するCYP2A7遺伝子をクローニングし、シーケネースVer. 2(United States Biochemical Co. 製)を用いるジデオキシ法、またはアプライドバイオシステムモデル373A DNAシーケンサーを用いて製造業者の提供したプロトコールに従って塩基配列を決定した。プローブとして使用したヒトCYP2A6の1.6 kb cDNAは、特開平9-187300号公報に記載の方法により調製した。

その結果、PMのCYP2A7遺伝子ではエキソン9部分の後半(3'-UTR)がCYP2A6遺伝子の3'-UTRと連結(直結)していることが明らかとなった。この連結領域を含む前後の領域の塩基配列を第1図および配列番号: 1(PM)に示し、EMの対応する領域の塩基配列も第1図および配列番号: 2(EM)に示す。第1図のSequence AとBは、いずれもCYP2A7遺伝子特異的な配列部分であるため、PMにおいてはこのSequence AとBの間のどこかで連結の行われたことが示された。すなわち、PMにおいてはCYP2A6遺伝子の3'-UTRのみが存在しており、CYP2A6遺伝子の5'-UTRおよび翻訳領域については完全に欠損している構造を有することが明らかとなった。こ

の全欠損型CYP 2A6 (CYP 2A6* 4C) の遺伝子構造と野生型CYP 2A6 (CYP 2A6* 1A) の遺伝子構造 (Biochemistry, 29, pp1322-1329 (1990)) との比較 (模式図) を、第2図に示す。

実施例2：置換型CYP 2A6遺伝子の構造解析

前記実施例1で同定された全欠損型遺伝子と野生型遺伝子との遺伝子構造の違いを利用し、全欠損型遺伝子をホモで有する者 (ホモ欠損者) を診断できる方法を開発した (Pharmaceutical Res., 15(4), pp517-524, 1998に診断法の概略のみ記載)。しかし、この診断法ではヘテロ欠損者は診断できず、その原因として、従来報告のない新たな多型遺伝子の存在が示唆された。そこで、この新たな多型遺伝子をクローニングする目的で、以下の実験を行った。

ヘテロ欠損と判定されたヒトの肝臓から、常法のグアニジニウム-チオシアネート法により全RNAを調製した。6 μ gの全RNAを、30 μ lの反応溶液中、ランダムヘキサマー (120 ng、Pharmacia 製) をプライマーとして、MMLV逆転写酵素 (0.2ユニット、Toyobo製) により逆転写した。Biochemistry 29: 1322-1329, 1990により報告されている配列に対して設計したプライマーの組合せを用いて、RT-PCRによりCYP 2A6 cDNAを得た。得られたすべてのクローンを、pBluescript SK(-) ベクター (Stratagene製) にサブクローニングし、アプライドバイオシステムスモデル377A自動DNAシーケンサーを用いて塩基配列を決定した。対照として、遺伝子型が野生型ホモと判定されたヒトの肝臓由来の全RNAから調製したCYP 2A6 cDNAも同様にクローニングし、塩基配列を決定した。

前記配列決定されたヘテロ欠損CYP 2A6 cDNAを、野生型CYP 2A6 cDNAと比較したところ、5' -UTRおよびタンパクコード領域は野生型と同じ配列を有していたが、3' -UTRの約60bpがCYP 2A7の対応領域に置換している新規な配列を有することが明らかとなった。この置換部位を含む前後の領域の塩基配列を第3図および配列番号：4 (置換型) に示し、野生型の

対応する領域の塩基配列も第3図および配列番号：3（野生型）に示す。

実施例3：新規な *CYP2A6* 遺伝子診断法の開発

実施例1および2で同定された *CYP2A6* 遺伝子の全欠損型および置換型の遺伝子構造を野生型のそれと比較することにより、これら3つのタイプの遺伝子をホモ又はヘテロで有する者を判別できる新たな診断法を開発した。

a) ゲノムDNAの調製

市販のゲノム抽出キット（Takara製等）を用いて、最低0.1 ml程度の末梢血から抽出したゲノムDNAを利用することができる。

b) プライマー

以下のプライマー：

CYP2A6-B4 5'-CAC CGA AGT GTT CCC TAT GCT G-3'（配列番号：5）

CYP2A6-UTRAS1 5'-TGT AAA ATG GGC ATG AAC GCC C-3'（配列番号：6）

をDNA合成装置を用いて合成し、Tris-EDTA緩衝液（pH7.4）に溶解後、滅菌水で10 μ Mに希釈する。第4図において、各プライマーがハイブリダイズする位置を右向きの矢頭（5'-プライマー、配列番号：5）および左向きの矢頭（3'-プライマー、配列番号：6）で示す。

c) LA-PCR法によるゲノムDNAの増幅

LA-PCR法を用いて、ゲノムDNAを増幅する。前記a)で調製したゲノムDNA溶液（1.0 μ l）に滅菌水を25.8 μ l、2.5 mM dNTPs 溶液を8.0 μ l、25 mM塩化マグネシウム溶液を5.0 μ l、10 \times LA-PCR緩衝液を5.0 μ l、10 μ Mセンスプライマー（CYP2A6-B4）を2.5 μ l、10 μ Mアンチセンスプライマー（CYP2A6-UTRAS1）を2.5 μ l、LA Taq DNAポリメラーゼ（5 U/ μ l、Takara製）を0.2 μ l加え、全量を50 μ lとする。さらに、ミネラルオイルを50 μ l重層し、94℃で3分間の変性反応の後、94℃1分間、50℃1分間、72℃2分間を1サイクルとして30サイクル、さらに72℃10分間の伸長反応を行

なう。

d) 判定方法

前記LA-PCRの結果、約1.3 kbpの増幅産物が得られる。これらのLA-PCR増幅産物を制限酵素AccIIで消化すると、置換型CYP2A6 (CYP2A6*1B)では約1.04 kbpと約0.28 kbpの断片に切断され、また全欠損型CYP2A6 (CYP2A6*4C)では約1.02 kbpと約0.28 kbpの断片に切断されるが、野生型CYP2A6 (CYP2A6*1A)では切断されないことに基づき、野生型CYP2A6の有無の判定を行なう(第4図、第5図a)。制限酵素による消化は、以下の条件で行なう。前記c)のLA-PCR反応終了液(5.0 μ l)に滅菌水を3.75 μ l、10 \times 制限酵素M溶液(Takara)を1.0 μ l、AccII(8 U/ μ l、Takara製)を0.25 μ l加え、全量を10 μ lとし、37 $^{\circ}$ Cで10時間インキュベートする。反応終了後、0.02%臭化エチジウムを含む2%アガロースゲルを用いて電気泳動を行ない、UV照射下でサイズマーカーDNAとの比較により判定する。

一方、約1.3 kbpのLA-PCR増幅産物を制限酵素Eco81Iで消化すると、全欠損型CYP2A6 (CYP2A6*4C)は、約0.73、0.43、0.1および0.04 kbpの断片に切断されるが、野生型CYP2A6 (CYP2A6*1A)と置換型CYP2A6 (CYP2A6*1B)では、約0.79、0.43および0.1 kbpの断片に切断される(第4図、第5図b；ただし0.1 kb及び0.04 kbのバンドはゲル上では殆ど観察されない)。制限酵素による消化は、以下の条件で行なう。前記c)のLA-PCR反応終了液(5.0 μ l)に滅菌水を3.5 μ l、10 \times 制限酵素M溶液(Takara)を1.0 μ l、Eco81I(8 U/ μ l、Takara)を0.5 μ l加え、全量を10 μ lとし、37 $^{\circ}$ Cで10時間インキュベートする。反応終了後、0.02%臭化エチジウムを含む2%アガロースゲルを用いて電気泳動を行ない、UV

照射下でサイズマーカーDNAとの比較により判定する。

この新規な診断方法を用いて、日本人健常者444名の判定を行った。得られたRFLPの例を第6図に示し、その結果を表1に要約する。第6図より、本発明の診断方法は、野生型（CYP2A6*1A）、置換型（CYP2A6*1B）および全欠損型（CYP2A6*4C）を含むすべての遺伝子型*1A/*1A、*1A/*1B、*1B/*1B、*1A/*4C、*1B/*4Cおよび*4C/*4Cを区別することができる。

表1

健常日本人におけるCYP2A6遺伝子型および対立遺伝子の頻度の分布

| 遺伝子型 | 数 | 頻度 (%) |
|-----------|-----|--------|
| 野生型／野生型 | 69 | 15.5 |
| 野生型／置換型 | 153 | 34.5 |
| 置換型／置換型 | 74 | 16.7 |
| 野生型／全欠損型 | 68 | 15.3 |
| 置換型／全欠損型 | 65 | 14.6 |
| 全欠損型／全欠損型 | 15 | 3.4 |
| 全体444 | | |
| 対立遺伝子 | 数 | 頻度 (%) |
| 野生型 | 359 | 40.4 |
| 置換型 | 366 | 41.2 |
| 全欠損型 | 163 | 18.4 |
| 全体888 | | |

表1に示すように、ヘテロ欠損者（野生型／全欠損型と置換型／全欠損型の和

）の頻度は、計算上推定される頻度とほぼ一致していたことから、この新規な診断法はホモ欠損者（全欠損型／全欠損型）のみならずヘテロ欠損者も正確に判別できる診断法であることが明らかとなった。

また、同じ診断方法を用いて、フランス人健常者 239 名の判定を行った。その結果を表 2 に示す。

表 2

欧米人（フランス人）における CYP2A6 遺伝子型および対立遺伝子の頻度の分布

| 遺伝子型 | 数 | 頻度 (%) |
|-----------|-----|--------|
| 野生型／野生型 | 99 | 41.4 |
| 野生型／置換型 | 97 | 40.6 |
| 置換型／置換型 | 24 | 10.1 |
| 野生型／全欠損型 | 19 | 7.9 |
| 置換型／全欠損型 | 0 | 0.0 |
| 全欠損型／全欠損型 | 0 | 0.0 |
| 全体 239 | | |
| 対立遺伝子 | 数 | 頻度 (%) |
| 野生型 | 314 | 65.7 |
| 置換型 | 145 | 30.3 |
| 全欠損型 | 19 | 4.0 |
| 全体 478 | | |

表 2 に示すように、フランス人では、ホモ欠損者〔すなわち、全欠損型遺伝子をホモで有する者（全欠損型／全欠損型）〕は、調べた範囲内では存在しなかった。一方、置換型に関しては、ヘテロ欠損者〔すなわち、置換型遺伝子をヘテロで有するもの（野生型／置換型と置換型／全欠損型）〕の頻度は、Hardy-Weinberg の法則で理論上算出される頻度とほぼ一致していた。従って、欧米人においても各遺伝子型を正確に判別できる診断法であることが明らかとなった。

配列表フリーテキスト

配列番号：5に記載の塩基配列からなるオリゴヌクレオチドは、PCR用に設計された5'－プライマーである。

配列番号：6に記載の塩基配列からなるオリゴヌクレオチドは、PCR用に設計された3'－プライマーである。

産業上の利用可能性

本発明の診断方法により、野生型、全欠損型および置換型 *CYP2A6* 遺伝子を判別することが可能であり、ヒト *CYP2A6* の基質となる物質の代謝能の個体差を事前に診断することによって、患者に応じた治療が可能となるという優れた効果を奏する。

請求の範囲

1. ヒトチトクロームP4502A6 (*CYP2A6*) の野生型遺伝子と、*CYP2A6* 遺伝子の変異に関連する少なくとも1種の変異型遺伝子の遺伝子構造の差異に基づいて、*CYP2A6* 遺伝子の遺伝子型を判定する方法。
2. 該変異型遺伝子に生じた少なくとも1つの変異が、ヒトチトクロームP4502A7 (*CYP2A7*) 遺伝子のエキソン9または*CYP2A6* 遺伝子のエキソン9に存在する、請求項1記載の方法。
3. *CYP2A6* 遺伝子の変異に関連する1種の変異型遺伝子を用いる遺伝子型の判定方法であって、該変異型遺伝子が配列番号：4に記載の塩基配列を含有する置換型*CYP2A6* 遺伝子である請求項1記載の方法。
4. *CYP2A6* 遺伝子の変異に関連する少なくとも2種の変異型遺伝子を用いて*CYP2A6* 遺伝子のホモ欠損およびヘテロ欠損を判定する請求項1記載の方法。
5. *CYP2A6* 遺伝子の変異に関連する少なくとも2種の変異型遺伝子が、配列番号：1に記載の塩基配列を含有する全欠損型*CYP2A6* 遺伝子および配列番号：4に記載の塩基配列を含有する置換型*CYP2A6* 遺伝子である、請求項4記載の方法。
6. PCR法および／またはハイブリダイゼーション法を含む方法により遺伝子構造の差異を解析することを特徴とする、請求項1～5いずれか記載の方法。

7. 下記工程：

- (a) ヒト組織からゲノムDNAを調製する工程、
 - (b) *CYP 2A 6*遺伝子のエキソン8および*CYP 2A 7*遺伝子のエキソン8のいずれにもハイブリダイズする5' -プライマー、ならびに*CYP 2A 6*遺伝子のエキソン9に特異的にハイブリダイズする3' -プライマーを調製する工程、
 - (c) 工程(a)で調製したゲノムDNAを鋳型とし、工程(b)で調製したプライマーをプライマー対としてPCR反応による増幅反応を行なう工程、ならびに
 - (d) 工程(c)で得られた増幅産物を制限酵素で消化して、制限酵素長多型を検出する工程、
- を含む、請求項1～6いずれか記載の方法。

8. 5' -プライマーが配列番号：5に記載の塩基配列を有し、3' -プライマーが配列番号：6に記載の塩基配列を有するものである、請求項7記載の方法。

9. 制限酵素がA c c IIまたはそのイソシゾマー、およびE c o 8 1 Iまたはそのイソシゾマーである、請求項7または8記載の方法。

10. 配列番号：4に記載の塩基配列における*CYP 2A 6*遺伝子と*CYP 2A 7*遺伝子との少なくとも1つの境界領域を含む、少なくとも5 b p以上の長さのDNA断片を用い、野生型*CYP 2A 6*遺伝子と置換型*CYP 2A 6*遺伝子との遺伝子構造の差異を解析することを含む、請求項6記載の方法。

11. 下記工程：

- (a) ヒト組織からゲノムDNAを調製する工程、

(b) 配列番号：4に記載の塩基配列における *CYP2A6* 遺伝子と *CYP2A7* 遺伝子との少なくとも1つの境界領域を含む、少なくとも5bp以上の長さのDNA断片を用い、工程(a)で調製したゲノムDNAまたはその断片とのハイブリダイゼーション反応を行う工程、を含む、請求項10記載の方法。

12. DNA断片が固相上に結合した形態であることを特徴とする、請求項10または11記載の方法。

13. *CYP* 遺伝子の遺伝子型の判定を行うに際し、請求項1～12いずれか記載の方法を含む方法により行うことを特徴とする *CYP* 遺伝子の遺伝子型の判定方法。

14. 配列番号：4に記載の塩基配列を含有する置換型 *CYP2A6* 遺伝子。

15. 配列番号：4に記載の塩基配列における *CYP2A6* 遺伝子と *CYP2A7* 遺伝子との少なくとも1つの境界領域を含む、少なくとも5bp以上の長さのDNA断片。

16. 配列番号：4に記載の塩基配列における *CYP2A6* 遺伝子と *CYP2A7* 遺伝子との2つの境界領域を含む、少なくとも60bp以上の長さのDNA断片。

17. 請求項15又は16記載のDNA断片の結合した固相。

18. 請求項15又は16記載のDNA断片、あるいは請求項17記載の固相を

含有してなる、*CYP*遺伝子の遺伝子型を判定するための診断キット。

19. 配列番号：5又は6に記載の塩基配列を有するDNA断片。

20. *CYP2A6*遺伝子のエキソン8および*CYP2A7*遺伝子のエキソン8のいずれにもハイブリダイズする5' -プライマー、*CYP2A6*遺伝子のエキソン9に特異的にハイブリダイズする3' -プライマー、*AccII*またはそのイソシゾマー、ならびに*Eco81I*またはそのイソシゾマーを含有してなる、*CYP2A6*遺伝子の遺伝子型を判定するための診断キット。

21. 5' -プライマーが配列番号：5に記載の塩基配列を有し、3' -プライマーが配列番号：6に記載の塩基配列を有するものである、請求項20記載の診断キット。

PM ACCATGAGCTTCCTGCCCCGCTGAGCGAGGGCTGTGCCGGTGCAGGTCTGGTGGGCGGGG

 EM ACCATGAGCTTCCTGCCCCGCTGAGCGAGGGCTGTGCCGGTGCAGGTCTGGTGGGCGGGG

CCAGGGAAAGGCGGGGT CAGGGCGGGGTTCGCGGAAGAGGCGGGTATAAGAATGGGGGA

 CCAGGGAAAGGCGGGGT CAGGGCGGGGTTCGCGGAAGAGGCGGGTATAAGAATGGGGGA

Sequence A

AGATGCGGGAAAGGAAGGGGCGTGGTGGCTAGAGGGAAGAGAAGAAACAGAAGGGGCTCA

 AGATGCGGGAAAGGAAGGGGCGTGGTGGCTAGAGGGAAGAGAAGAAACAGAAGGGGCTCA

GTTACCTTGATAAGGTGCTTCCGAGCTGGGATGAGAGGAAGGAAACCTTACATTATGC
 ***** * *****
 GTTACCTTGATAAGGTGCTTCCGAGCTGGGATGAGAGGAAGGAAACCTTACATTATGC


Sequence B


TATGAAGAGTAGTAATAATAGCAGCTCTTATTTCTGAGCACGTACCCCCGTGTCACCTT

 TATGAAGAGTAGTAATAATAGCAGCTCTTATTTCTGAGCACGTACCCCCGTGTCACCTT

TGTTCAAAAACCATTCACGCTCACC  TAATTGCCACAAACCTCTGC  GAA

 TGTTCAAAAACCTATTGCACGCTCACC  TAATTGCCACAAACCTCTGC  GAA

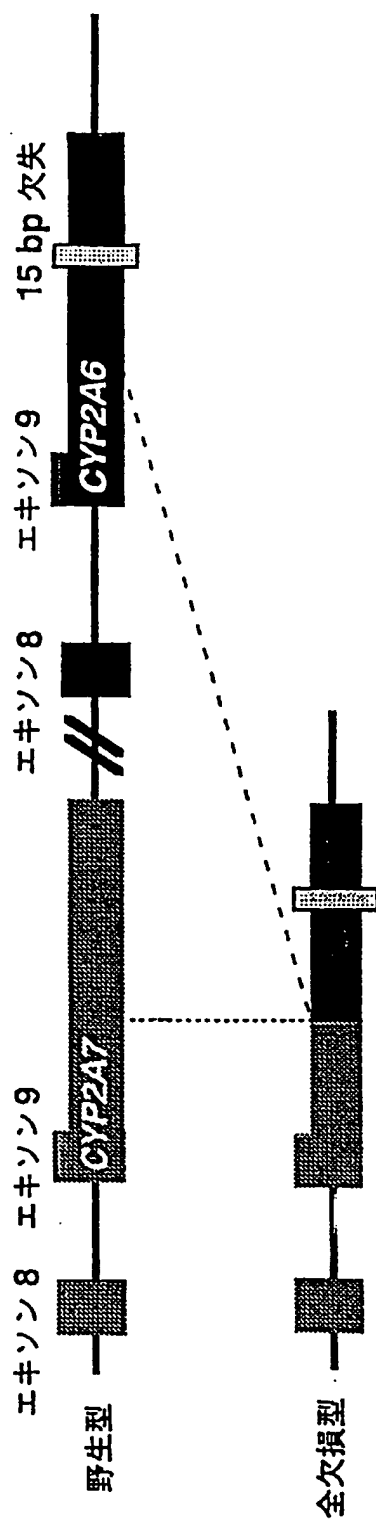
GGGCGTTCATGCCCATTTTACACGTGACAAACTGAGGCTTAGAAAGTTGTCTC  TG

 AAGCGTTCATGCCCATTTTACACGTGACAAAGCTGAGGCTTAGAAAGTTGGCTC  TG

ATGTCTCACAAACATAAGTGCCAGAAAATCTTTGAACACAGATC

 ATGTCTCACAAACATAAGTGCCAGAAAATCTTTGAACACAGATC

第 1 図



第 2 図

3'-UTR
 野生型 GCGAGGGCTGTGCCGGTGCAGGTCTGGTGGGCGGGGCCAGGGAAAGGGCAGGGCCAAGAC

 置換型 GCGAGGGCTGTGCCGGTGCAGGTCTGGTGGGCGGGGCCAGGGAAA-GGCGGGGTCAGGGC
 CCGGCTTGGGAGAGGGGCGCAGCTAAGACTGGGGGCAGGATGGCGGAAAGGAAGGGGCGT
 *** * * * * *
 GGGGTTCGCGGAAGAGGCGGTATAAGAATGGGGGAAGATGCGGGAAAGGAAGGGGCGT
 GGTGGCTAGAGGGAAGAGAAGAAACAGAAGCGGCTCAGTTCACCTTGATAAGGTGCTTCC

 GGTGGCTAGAGGGAAGAGAAGAAACAGAAGCGGCTCAGTTCACCTTGATAAGGTGCTTCC
 GAGCTGGGATGAGAGGAAGGAAACCCTTACATTATGCTATGAAGAGTAGTAATAATAGCA

 GAGCTGGGATGAGAGGAAGGAAACCCTTACATTATGCTATGAAGAGTAGTAATAATAGCA
 GCTCTTATTTCCTGAGCACGTACCCCGTGTACCTTTGTTCAAAAACCATTCGACGCTC

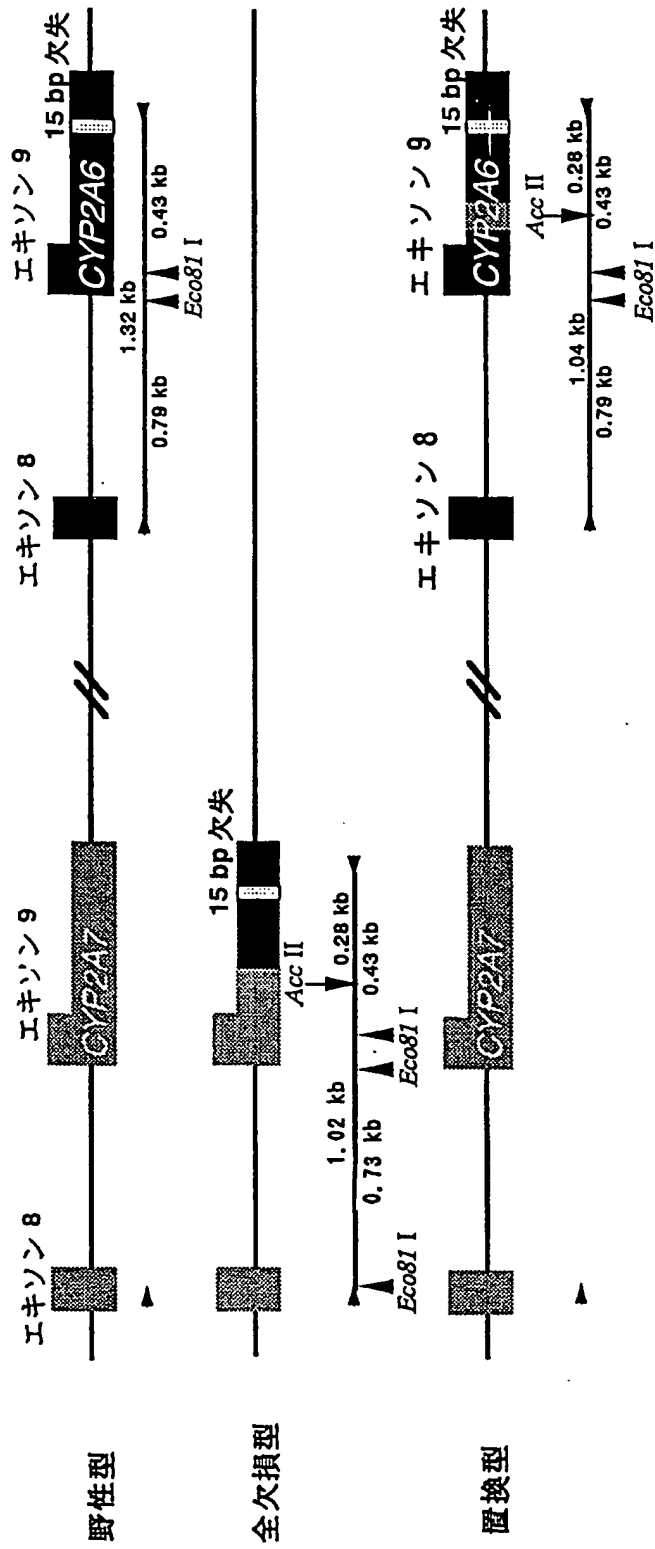
 GCTCTTATTTCCTGAGCACGTACCCCGTGTACCTTTGTTCAAAAACCATTCGACGCTC
 ACCTAATTGCCACAAACCTCTGCGAAGGGCGTTCATGCCCATTTTACACGTGACAAAAC

 ACCTAATTGCCACAAACCTCTGCGAAGGGCGTTCATGCCCATTTTACACGTGACAAAAC
 GAGGCTTAGAAAGTTGTCTCTGATGTCACAAAACATAAGTGCCAGAAAATCCTTGAA

 GAGGCTTAGAAAGTTGTCTCTGATGTCACAAAACATAAGTGCCAGAAAATCCTTGAA
 CACAGATC

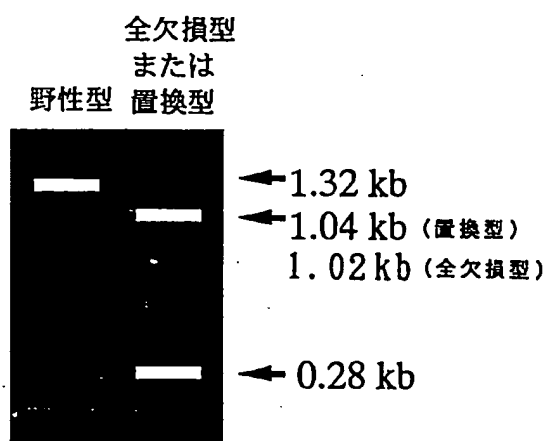
 CACAGATC

第 3 図

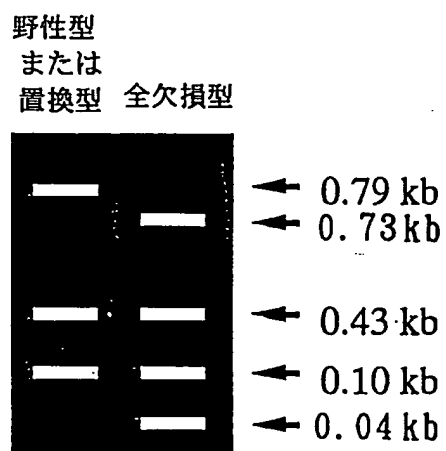


第 4 図

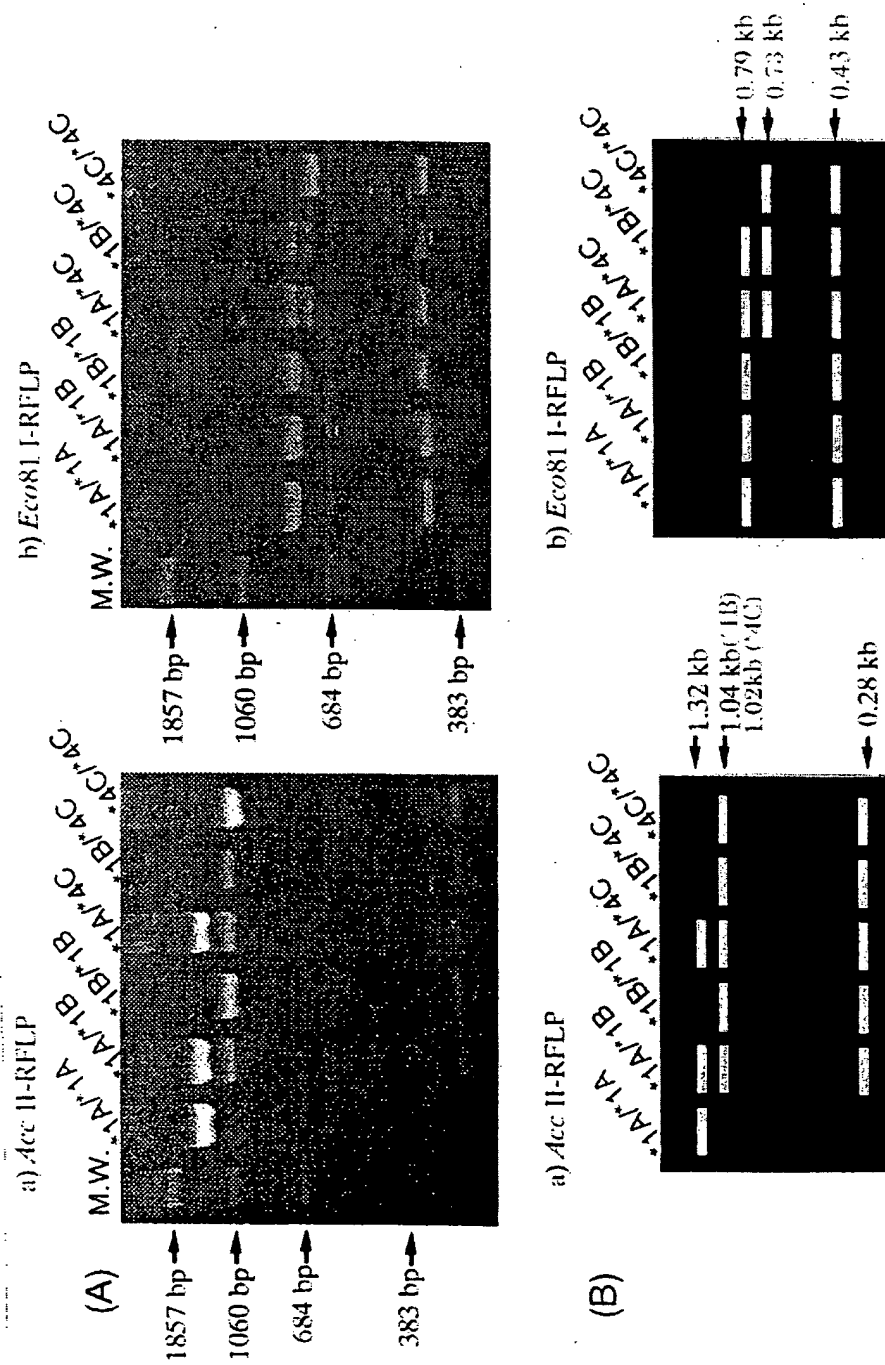
a)



b)



第 5 図



第 6 図

配列表

SEQUENCE LISTING

<110> Sumitomo Pharmaceuticals Co., Ltd.

<120> Method for Diagnosis of CYP2A6 Gene

<130> 00-029-PCT

<150> JP 11-122725

<151> 1999-4-28

<150> JP 2000-52623

<151> 2000-2-29

<160> 6

<210> 1

<211> 451

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

```
accatgagct tcctgccccg ctgagcgagg gctgtgccgg tgcaggtctg gtggcgggg 60
ccagggaag gcggggtcag ggcggggttc gcggaagagg cgggtataag aatgggggga 120
agatgcggga aaggaagggg cgtggtggct agaggaaga gaagaaacag aaggggctca 180
gttcaccttg ataaggtgct tccgagctgg gatgagagga aggaaaccct tacattatgc 240
```

tatgaagagt agtaataata gcagctctta tttcctgagc acgtaccccc gtgtcacctt 300
 tgttcaaaaa ccattgcacg ctcacctaata tgccacaaac ctctgcgaag ggcgttcattg 360
 cccattttac acgtgacaaa actgaggctt agaaagttgt ctctgatgtc tcacaaaaca 420
 taagtgccca gaaaatcttt gaacacagat c 451

<210> 2

<211> 466

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

accatgagct tcctgccccg ctgagcgagg gctgtgccgg tgcaggtctg gtgggcgggg 60
 ccagggaag gcggggtcag ggcgggggtc gcggaagagg cgggtataag aatgggggga 120
 agatgcggga aaggaagggg cgtggtggct agagggaaga gaagaaacag aaggggctca 180
 gttcaccttg ataaggtgct tccgtggtgg gatgagagga aggaaaccct tacattatgc 240
 tatgaagagt agtaataata gcagctctta tttcctgagc acgtaccccc gtgtcacctt 300
 tgttcaaaaa ctattgcacg ctcacctcac ttaattgccaa caaacctctg cgaaggggaa 360
 aagcgttcatt gccatttta cacgtgacaa agctgaggct tagaaagttg gctctatctg 420
 atgtctcaca aaacataagt gcccgaaaaa tctttgaaca cagatc 466

<210> 3

<211> 428

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

gcgagggctg tgccggtgca ggtctggtgg gcggggccag ggaaagggca gggccaagac 60
 cgggcttggg agaggggcg c agctaagact gggggcagga tggcggaaag gaaggggcgt 120
 ggtggctaga gggaagagaa gaaacagaag cggctcagtt caccttgata aggtgcttcc 180
 gagctgggat gagaggaagg aaacccttac attatgctat gaagagtagt aataatagca 240
 gctcttattt cctgagcacg taccctcggtg tcacctttgt tcaaaaacca ttgcacgctc 300
 acctaatgac cacaacctc tgcgaagggc gtcatgccc attttacacg tgacaaaact 360
 gaggcctaga aagttgtctc tgatgtctca caaacataa gtgccagaa atctttgaa 420
 cacagatc 428

<210> 4

<211> 427

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 4

gcgagggctg tgccggtgca ggtctggtgg gcggggccag ggaaaggcgg ggtcagggcg 60
 gggttcgcgg aagaggcggg tataagaatg gggggaagat gcgggaaagg aaggggcgtg 120
 gtggctagag ggaagagaag aaacagaagc ggctcagttc accttgataa ggtgcttccg 180
 agctgggatg agaggaagga aacccttaca ttatgctatg aagagtagta ataatagcag 240
 ctcttatttc ctgagcacgt accctcggtg cacctttgtt caaaaacat tgacgctca 300
 cctaattgcc acaaacctct gcgaagggcg ttcatgcca ttttacacgt gacaaaactg 360
 aggcttagaa agttgtctct gatgtctcac aaaacataag tgcccagaaa atctttgaac 420
 acagatc 427

<210> 5

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed sequence is 5' primer used for PCR.

<400> 5

caccgaagtg ttccctatgc tg

22

<210> 6

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed sequence is 3' primer used for PCR.

<400> 6

tgtaaaatgg gcatgaacgc cc

22

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/02807

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12Q 1/68, C12N 15/11, C12N 15/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12Q 1/00-70, C12N 15/00-90

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA (STN), REGISTRY (STN), WPI (DIALOG),
BIOSIS (DIALOG), GenBank/EMBL/DBJ/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-------------|--|------------------------|
| X Y A | Pharmaceutical Research, Vol.15, No.4, (1998), pp.330-338, T. Yokoi, et al. "Genetic Polymorphism of Drug Metabolizing Enzymes: New Mutations in CYP2D6 AND CYP2A6 Genes in Japanese." | 1,6 4 2,3,5,7-21 |
| X A | JP, 9-187300, A (SUMITOMO PHARMACEUTICALS COMPANY LIMITED), 22 July, 1997 (22.07.97) (Family: none) | 19 20,21 |
| X A | Biotechnology, Vol.29, No.5, (1990), pp.1322-1329, S.Yamano, et al. "The CYP2A3 gene product catalyzes coumarin 7-hydroxylation in human liver microsomes." | 19 20,21 |
| A | WO, 95-34679, A2 (US Dept.Health & Human Services), 21 December, 1995 (21.12.95) & US, 5891633, A & GB, 2302853, A | 14-18 |
| A | Am. J. Hum. Genet., Vol.57, No.3, (1995), pp.651-660, Idle J.R., et al. "A genetic polymorphism in coumarin 7-hydroxylation: sequence of the human CYP2A genes and identification of variant CYP2A6 alleles." | 14-18 |

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

| | |
|---|---|
| * Special categories of cited documents: | "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention |
| "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance | "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone |
| "E" earlier document but published on or after the international filing date | "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art |
| "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) | "&" document member of the same patent family |
| "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means | |
| "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed | |

Date of the actual completion of the international search
01 August, 2000 (01.08.00)Date of mailing of the international search report
12 September, 2000 (12.09.00)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JPO0/02807

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl' C12Q 1/68, C12N 15/11, C12N 15/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl' C12Q 1/00-70, C12N 15/00-90

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA(STN)、REGISTRY(STN)、WPI(DIALOG)、
BIOSIS(DIALOG)、GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
|---------------------------|--|---|
| <u>X</u> <u>Y</u> A | Pharmaceutical Research, Vol.15, No.4, (1998), p.330-338, T. Yokoi, et al. "Genetic Polymorphism of Drug Metabolizing Enzymes: New Mutations in CYP2D6 AND CYP2A6 Genes in Japanese." | <u>1, 6</u> <u>4</u> 2, 3, 5, 7-21 |
| <u>X</u> A | JP,9-187300,A (住友製薬株式会社), 22.7月.1997 (22.07.97), ファミリーなし | <u>19</u> 20, 21 |

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

01.08.00

国際調査報告の発送日

12.09.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

齊藤真由美

4B

8931

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

| C (続き) . 関連すると認められる文献 | | |
|-----------------------|--|---------------------|
| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
| <u>X</u> A | Biotechnology, Vol. 29, No. 5, (1990), p. 1322-1329, S. Yamano, et al. " The CYP2A3 gene product catalyzes coumarin 7-hydroxylation in human liver microsomes. " | <u>19</u> 20, 21 |
| A | WO, 95-34679, A2 (US Dept. Health & Human Services) 21. 12月. 1995 (21. 12. 95) & US, 5891633, A & GB, 2302853, A | 14-18 |
| A | Am. J. Hum. Genet., Vol. 57, No. 3, (1995), p. 651-660, Idle J.R., et al. " A genetic polymorphism in coumarin 7-hydroxylation: sequence of the human CYP2A genes and identification of variant CYP2A6 alleles. " | 14-18 |